Archive of SID

اثر ترکیبی کودهای شیمیایی و محیط کشت BG11 بر سرعت رشد، ترکیب بیوشیمیایی، کلروفیل و مقدار کارتنوئید کل جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* (*Haematococcus pluvialis*) در آب لب‌شور

سعید وحدت*[1]، بهروز آتشبار[2]، منیژه بیابانی اسرمی[3]، فرزانه نوری[2]

[1]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

[2]پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[3]گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: saeidvahdat1989@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱۵

چکیده

استفاده از روش‌های استاندارد برای تولید جلبک‌های تک سلولی، هزینه‌های زیادی در برداشته و در موارد زیادی مقرون به صرفه نمی‌باشد. بنابراین استفاده از کودهای شیمیایی می‌تواند جایگزین مناسبی برای تولید جلبک‌های تک سلولی به شمار آید. در همین راستا مقدار $۴/۲۵\times۱۰^{۴}$ جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* به هر ظرف ۳ لیتری اضافه گردید. نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای نرخ رشد ویژه، میزان تقسیم سلولی در روز، بازدهی تثبیت دی اکسید کربن، بازدهی زیست توده و زیست توده کل نشان داد که تیمار ۷ بالاترین و تیمار ۱ پایین‌ترین مقدار را دارد ($P<۰/۰۵$). بالاترین محتوای پروتئینی در تیمار ۶، چربی در تیمار ۷ و کربوهیدرات در تیمارهای ۳ و ۴ به ترتیب برابر با ۳۲/۳۵ درصد، ۳۵/۴۶ درصد و ۳۱/۰۱ و ۳۲/۱۹ درصد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در تیمار ۵ بالاترین محتوای کلروفیل *a* و در تیمار ۳ بالاترین محتوای کلروفیل *b* و کارتنوئید کل مشاهده شد که مقادیر به‌دست آمده به‌ترتیب برابر با ۴۴/۶۰، ۶۲/۱۹ و ۱۵۲/۷۳ میکروگرم بر گرم وزن‌تر بودند ($P<۰/۰۵$).

واژگان کلیدی: *هماتوکوکوس پلوویالیس*، ترکیب بیوشیمیایی، کلروفیل، کارتنوئید کل.

مقدمه

هماتوکوکوس پلوویالیس یک جلبک تک‌سلولی دو تاژکی سبزرنگ می‌باشد که قادر به تولید سلول‌های مقاومی به نام سیست و یا آپلانوسپور (*Aplanospore*) تحت شرایط استرس است (Boussiba *et al*., 1999; Boussiba, 2000) که موجب تجمع آستاگزانتین و چربی در سلول می‌باشد (Grünewald *et al*., 2001; Damiani *et al*., 2006; Cerón *et al*., 2007). این جلبک و چندین گونه از ریز جلبک‌های دیگر قادر به رشد و زنده ماندن در شرایط گسترده محیطی را دارند که قادرند متابولیسم چربی را در پاسخ به شرایط مختلف استرسی تغییر دهند (Roessler, 1990; Guschina and Harwood, 2006; Hu et al., 2008) که این میکروجلبک‌ها را به ارگانیزم‌های ایده‌آل برای ساخت تری گلیسرول‌های غیرقطبی (TAGs) تبدیل می‌کند. محتوای چربی به هنگامی که سلول‌های جلبکی در شرایط پرورشی نامناسب مانند شوری بالا، تهی شدن نیتروژن (Yu *et al*., 1987; Illman *et al*., 2000; Zhekisheva *et al*., 2002) و شدت نور بالا (Gordillo *et al*., 1998) قرار بگیرند، افزایش می‌یابد. به‌علاوه ترکیبات چربی در میکروجلبک‌ها به سن پرورش و مراحل مختلف چرخه زندگی بستگی دارد (Fidalgo *et al*., 1998).

تغییرات در ترکیبات محیط کشت جلبک می‌تواند ترکیبات بیوشیمیایی جلبک‌ها را مانند مقدار چربی، پروتئین، رنگدانه‌ها و کربوهیدرات تغییر دهد. تغییر در مواد مغذی محیط کشت می‌تواند به‌صورت معنی‌داری، مقدار زیست توده سلولی تولید شده را در طی کشت جلبک‌ها تغییر دهد (Mandalam and Palsson, 1998). غلظت نمک در آب از طریق اثر گذاشتن بر تنش‌های اسمزی، استرس شوری و نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

یونی سلول‌ها عمل می‌کند (Kumar *et al*., 2015) ولی در جلبک‌های دریایی از فاکتور شوری انتظار می‌رود که بر یک سری از فعالیت‌های متابولیسمی مخصوصاً بر ترکیبات مهم غشای سلولی مانند چربی‌ها (Takagi and Karseno, 2006) اثر بگذارد.

هدف از انجام این مطالعه (۱) استفاده از کودهای شیمیایی با نسبت نیتروژن به فسفر برابر با محیط کشت استاندارد BG11 برای پرورش جلبک و بررسی امکان کشت ریزجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* با کودهای شیمیایی، (۲) بررسی امکان پرورش جلبک آب شیرین *هماتوکوکوس پلوویالیس* در آب لب‌شور و (۳) بررسی مشخصه‌های شیمیایی و رشد این جلبک در شرایط پرورش در آب لب‌شور با استفاده از محیط کشت استاندارد BG11 و کودهای شیمیایی می‌باشد. اگرچه کشت ریزجلبک‌ها نیاز به زمین زراعی ندارد، ولی به‌دلیل نیاز بالا به مقادیر زیاد آب، کود و انرژی خورشیدی، تنها در مکان‌های محدودی امکان اجرا دارند (Varshney *et al*., 2015) و از این رو بررسی امکان پرورش جلبک آب شیرین *هماتوکوکوس پلوویالیس* در آب‌های شور و با استفاده از کودهای شیمیایی صنعتی احتمالاً می‌تواند در برخی مناطق مستعد کشت این جلبک، کمک زیادی به رفع هزینه‌های مربوط به تأمین آب، کود و انرژی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

استوک خالص جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* از پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری دانشگاه ارومیه تهیه شد. از ظروف ۳ لیتری برای پرورش جلبک استفاده گردید. به هر ظرف به اندازه‌ای استوک جلبک اضافه شد تا تمامی ظروف به تراکم $۴/۲۵\times۱۰^{۴}$ سلول در میلی‌لیتر رسیدند. شوری آب پرورشی ۷/۵ گرم بر لیتر، اسیدیته اولیه ۸ و دمای محیط پرورش ۱±۲۱ بود. برای نوردهی به‌جلبک‌ها از نور سرد با شدت نوری ۳۰۰۰-۳۵۰۰ لوکس استفاده شد. هر یک از ظروف با هوادهی که هریک متصل به پیپت فیلتردار بودند، به‌صورت مداوم هوادهی شدید می‌شدند (مقدار هوادهی برابر با ۷۵۸ میلی لیتر در دقیقه بود). برای هر یک از تیمارها، تعداد ۳ تکرار درنظر گرفته شد. تیمارهای این مطالعه به صورت تیمار ۱= رزاسول ۱۰۰٪، تیمار ۲= روزاسول ۵۰٪ + (اوره + سوپر فسفات) ۵۰٪، تیمار ۳= رزاسول ۷۵٪ + (اوره + سوپر فسفات) ۲۵٪، تیمار ۴= رزاسول ۲۵٪ + (اوره + سوپر فسفات) ۷۵٪، تیمار ۵= اوره + سوپر فسفات ۱۰۰٪، تیمار ۶= BG11 در محیط پرورش آب شیرین ۱۰۰٪ و تیمار ۷= BG11 در محیط پرورش آب شور ۱۰۰٪ درنظر گرفته شدند. (نسبت نیتروژن به فسفر در تیمارها بر اساس محیط کشت BG11 برابر با ۱۰ به ۱ درنظر گرفته شد).

اندازه‌گیری مقدار نیتروژن، فسفر و آهن کودهای شیمیایی: برای اندازه‌گیری مقادیر نیتروژن، فسفر و آهن در کودهای شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از دستگاه پالین تست (مدل ۷۱۰۰، ساخت انگلستان) استفاده گردید.

اندازه‌گیری رشد سلولی: مقدار ۱ میلی‌لیتر جلبک زنده از محیط پرورش برداشت شده و در طول موج ۶۸۰ نانومتر خوانده شد (Wang *et al*., 2014) و سپس با استفاده از رابطه وزن خشک و غلظت، معادله زیر برای محاسبه مقدار زیست توده بر حسب گرم بر لیتر به دست آمد:

$$\text{Biomass } (g.L^{-1}) \text{ Haematococcus} = 0.796 * OD_{680} - 0.1086 \quad R^2 = 0.977$$

بازدهی زیست توده (گرم بر لیتر در روز) از اختلاف غلظت زیست توده (گرم بر لیتر) تقسیم بر محدوده زمانی مشخصی (روز) بر اساس فرمول زیر به دست آمد (Tang *et al*., 2011):

$$P\ (g.L^{-1}.d^{-1}) = (X_1 - X_0) / (T_1 - T_0)$$

نرخ رشد ویژه (d^{-1}) از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\mu = (\ln X_1 - \ln X_0) / (T_1 - T_0)$$

همچنین مقدار تقسیم بر روز و مدت زمان دوبرابر شدن از فرمول‌های زیر به‌دست آمد:

$$\text{Divisions per day } (day^{-1}) = \mu / 0.9631$$

www.SID.ir

Archive of SID

$$\text{Generation time } (h^{-1}) = 0.9631/\mu$$

به‌طوری‌که X_0 , X_1 به ترتیب غلظت زیست توده (گرم بر لیتر) در روزهای T_1 و T_0 می‌باشند (Guillard, 1973). بازدهی میزان تثبیت کربن دی اکسید از طریق اندازه‌گیری مقدار مصرف کربن دی اکسید توسط ریزجلبک و با استفاده از معادله زیر به دست آمد (Ho *et al.*, 2010):

$$P\ co_2\ (g\ l^{-1}d^{-1}) = 1.88 \times Ps$$

Ps بازدهی زیست توده بر حسب گرم بر لیتر می‌باشد.

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کاروتنید کل: مقدار ۵۰ سی‌سی از محیط پرورش هر تیمار به طور جداگانه با استفاده از فیلتر واتمن آبی رنگ فیلتر و توزین گردید. جهت استخراج رنگدانه از ۵۰ میلی لیتر متانول ۹۶ درصد به ازای هر گرم نمونه استفاده گردید. سپس نمونه به مدت یک دقیقه با ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هموژن شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ شد. از محلول رویی به جهت خوانش در طول موج‌های ۶۶۶، ۶۵۳ و ۴۷۰ استفاده شد از فرمول‌های زیر برای بدست آوردن کاروتن کل استفاده شد.

$$C_a = 15.65A666 - 7.340A653$$
$$C_b = 27.05A653 - 11.21A666$$
$$C_c = 1000A470 - 2.860Ca - 129.2Cb\ /245$$

C_a مقدار کلروفیل *a*، C_b مقدار کلروفیل *b* و C_c مقدار کاروتن کل را بر حسب میکروگرم بر گرم از وزن تر محاسبه می‌کنند (Dere *et al.*, 1998).

آنالیز مقدار چربی و خاکستر: برای اندازه‌گیری مقدار چربی کل از دستگاه سوکسله و به‌واسطه چربی‌شویی نمونه‌ها با دی اتیل اتر ۹۶ درصد و خاکستر به واسطه سوزاندن نمونه‌ها در کوره در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۶ ساعت استفاده شد (A.O.A.C, 2005).

تعیین مقدار محتوای پروتئینی: مقدار ۵ میلی‌گرم از جلبک خشک شده درون ۰/۲ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TSA) ۲۴ درصد (w/v) مخلوط و به‌هم زده شد، سپس مخلوط برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، انکوباسیون شد و در دمای اتاق سرد شد. بعد از آن ۶۰۰ میکرولیتر آب کاملاً خالص به مخلوط اضافه شد. هموژن به دست آمده برای مدت زمان ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد و محلول رویی آن دور ریخته شد. پلت‌های باقی مانده در ظرف در ۰/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر لوری به‌حالت سوسپانسیون دوباره درآمد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. نمونه‌ها بعد از سرد شدن در دمای اتاق، برای مدت زمان ۲۰ دقیقه (در دمای اتاق) و با دور ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و محلول رویی آن نگه داشته شد. سپس محلول رویی برای مدت ۳۰ دقیقه در محلول لوری قرار داده شد و جذب هر نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (Slocombe *et al.*, 2013).

تعیین مقدار کربوهیدرات کل: مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از وزن خشک جلبک وزن شد و ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲/۵ نرمال به آن اضافه شد و برای مدت زمان ۳ ساعت درون بن ماری حاوی آب جوش قرار گرفت. بعداز خنک شدن در دمای محیط با استفاده از سدیم کربنات جامد خنثی شد و به مخلوط به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. مخلوط سانتریوفیوژ شد (۵۰۰۰ دور بر دقیقه برای مدت ۵ دقیقه) و سپس مقدار ۱۰۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی برای آنالیز برداشته شد. مقدار ۴ میلی‌لیتر واکنشگر آنترون (۰/۲ درصد) به نمونه‌ها اضافه شد و برای مدت ۸ دقیقه درون بن ماری حاوی آب جوش قرار گرفت. نمونه‌ها به سرعت سرد شده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شدند (Hedge and Hofreiter, 1962).

آنالیز آماری: نرمال بودن کلیه داده‌ها توسط تست‌های کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شدند. از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی (Tukey) در سطح ۵ درصد ($P<0/05$) استفاده شد. محاسبه داده‌ها و ترسیم نمودارها توسط نرم افزاری SPSS

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- اثر محیط کشت‌های استاندارد و کودهای شیمیایی بر نرخ رشد ویژه، مدت زمان تقسیم شدن در روز، تولید نسل، بازدهی تثبیت کربن دی اکسید، بازدهی زیست توده ($\times 10^{-2}$) و مقدار زیست توده کل ($\times 10^{-2}$) در جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس*.

تیمارها	نرخ رشد ویژه (SGR)	تقسیم شدن در روز (d^{-1})	تولید نسل (h^{-1})	بازدهی تثبیت کربن دی اکسید (میلی-گرم بر لیتر در روز)	بازدهی زیست توده (گرم بر لیتر در روز)	زیست توده کل (گرم بر لیتر)
۱	۰/۱۵±۰/۰۱^{a}	۰/۲۲±۰/۰۱^{a}	۴/۶۰±۰/۱۷^{d}	۶/۴۵±۰/۴۹^{a}	۰/۳۴±۰/۰۲^{a}	۳/۷۷±۰/۲۹^{a}
۲	۰/۲۳±۰/۰۰^{b}	۰/۳۳±۰/۰۱^{b}	۳/۰۲±۰/۴۸^{c}	۱۷/۴۴±۰/۷۶^{b}	۰/۹۳±۰/۰۴^{b}	۱۰/۲۱±۰/۴۵^{b}
۳	۰/۲۶±۰/۰۰^{d}	۰/۳۸±۰/۰۱^{d}	۲/۶۲±۰/۴۰^{ab}	۲۶/۲۷±۱/۲۵^{d}	۱/۴۰±۰/۰۶^{d}	۱۵/۳۷±۰/۷۴^{d}
۴	۰/۲۵±۰/۰۱^{c}	۰/۳۶±۰/۰۱^{c}	۲/۷۹±۰/۰۸^{b}	۲۱/۸۷±۱/۸۶^{c}	۱/۶۴±۰/۰۹^{c}	۱۷/۸۰±۱/۰۹^{c}
۵	۰/۲۷±۰/۰۱^{e}	۰/۳۹±۰/۰۱^{e}	۲/۵۶±۰/۰۹^{a}	۲۸/۳۰±۳/۲۰^{e}	۱/۵۱±۰/۱۷^{e}	۱۶/۵۶±۱/۸۷^{d}
۶	۰/۲۸±۰/۰۰^{e}	۰/۴۱±۰/۰۰^{e}	۲/۴۵±۰/۰۰^{a}	۳۲/۳۹±۰/۱۶^{e}	۱/۷۲±۰/۰۱^{e}	۱۸/۹۵±۰/۰۹^{e}
۷	۰/۲۹±۰/۰۰^{f}	۰/۴۱±۰۰^{e}	۲/۴۲±۰/۰۰^{a}	۳۴/۰۲±۰/۱۴^{f}	۱/۸۱±۰/۰۱^{f}	۱۹/۹۱±۰/۰۸^{f}

حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشند.

جدول ۲- اثر محیط کشت‌های استاندارد و کودهای شیمیایی بر مقدار پروتئین، چربی و خاکستر در جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس*.

	پروتئین (٪)	چربی (٪)	خاکستر (٪)	کربوهیدرات کل (٪)
۱	۲۹/۴۷±۰/۴۳^{d}	۳۴/۶۹±۲/۱۲^{bc}	۱۰/۵۴±۲/۴۷^{c}	۲۳/۲۰±۰/۱۵^{a}
۲	۲۶/۴۰±۰/۲۸^{bc}	۳۰/۲۷±۰/۰۳^{ab}	۱۴/۷۰±۰/۲۲^{d}	۲۶/۴۲±۰/۹۴^{b}
۳	۲۵/۷۴±۰/۸۳^{b}	۳۳/۵۶±۲/۴۴^{b}	۷/۶۶±۰/۳۳^{a}	۳۱/۰۱±۰/۵۹^{d}
۴	۳۰/۱۰±۰/۴۷^{d}	۲۸/۱۰±۰/۰۱^{a}	۷/۴۶±۱/۳۴^{a}	۳۲/۱۹±۰/۱۵^{d}
۵	۲۷/۵۳±۰/۲۱^{c}	۲۸/۰۹±۱/۶^{a}	۶/۳۷±۰/۱۵^{a}	۳۵/۰۴±۰/۲۱^{e}
۶	۳۲/۳۵±۰/۱۷^{e}	۲۷/۷۱±۰/۸۴^{a}	۸/۱۹±۰/۰۵^{b}	۲۹/۶۱±۰/۲۹^{c}
۷	۲۳/۳۶±۰/۰۸^{a}	۳۵/۴۶±۰/۱۹^{c}	۱۰/۱۹±۰/۱۷^{b}	۲۸/۵۹±۰/۱۷^{c}

حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشند.

(نسخه ۲۲) و Excel (نسخه ۲۰۱۳) انجام گردید.

نتایج

میزان نیتریت، نیترات، آمونیوم، فسفر و آهن در کودهای اوره، سوپرفسفات و رزاسول به‌ترتیب برابر با ۱۰ و ۰ و ۳/۲، ۲/۱۸۸ و ۰/۷۰۵ و ۵/۲۴۶، ۵/۸ و ۴/۶ و ۸/۲، ۱/۴ و ۱۱ و ۱۴ و ۰/۱ و ۰/۰۹ و ۱/۶ بود. بررسی فاکتورهای نرخ رشد ویژه، میزان تقسیم شدن در روز، بازدهی تثبیت دی اکسید کربن، بازدهی زیست توده و زیست توده کل در بین تیمارهای مورد مطالعه، که در جدول ۱ نشان داد که تیمار ۷ (BG11 در محیط آب شور) بالاترین مقدار را داراست ($P<0/05$) و کمترین مقادیر به دست آمده در تیمار ۱ (۱۰۰٪ رزاسول) مشاهده شد ($P<0/05$).

بر اساس نتایج جدول ۲، بالاترین محتوای پروتئینی در تیمار ۶ (BG11 در محیط آب شیرین)، چربی در تیمار ۷ (BG11 در محیط آب شور) و خاکستر در تیمار ۲ (رزاسول + اوره و سوپرفسفات با نسبت ۵۰:۵۰) به‌ترتیب برابر با ۳۲/۳۵ درصد، ۳۵/۴۶ درصد و ۱۴/۷۰ درصد مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان دادند ($P<0/05$). مقدار کربوهیدرات کل در تیمارهای ۳ و ۴ نسبت به سایر تیمارها مقدار بالاتری را نشان دادند و دارای تفاوت معناداری بودند ($P<0/05$) که به‌ترتیب برابر با ۳۱/۰۱ و ۳۲/۱۹ درصد بودند.

در تیمار ۵ (۱۰۰٪ اوره و سوپرفسفات) بالاترین محتوای کلروفیل *a* و در تیمار ۳ (۷۵٪ رزاسول + ۲۵٪ اوره و سوپرفسفات) بالاترین محتوای کلروفیل *b* و کاروتن کل مشاهده شد که مقادیر به‌دست آمده به ترتیب برابر با ۴۴/۶۰، ۶۲/۱۹ و ۱۵۲/۷۳ میکروگرم بر گرم وزن‌تر بودند ($P<0/05$) (جدول ۳).

بحث

ترکیبات محیط کشت اثر معنی‌داری بر رشد و غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- اثر محیط کشت‌های استاندارد و کودهای شیمیایی بر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتن کل در جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس*.

تیمارها	کلروفیل آ (میکروگرم بر گرم وزن‌تر)	کلروفیل ب (میکروگرم بر گرم وزن‌تر)	کاروتن کل (میکروگرم بر گرم وزن‌تر)
۱	۱۸/۵۴±۰/۸۷^{b}	۲۳/۹۲±۰/۶۷^{b}	۵۲/۵۹±۱/۴۳^{b}
۲	۲۰/۱۴±۲/۰۰^{b}	۳۷/۶۳±۱/۸۱^{c}	۸۷/۹۸±۴/۳۱^{c}
۳	۲۹/۹۴±۱/۹۸^{d}	۶۲/۱۹±۴/۴۲^{e}	۱۵۲/۷۳±۱۱/۰۳^{e}
۴	۲۵/۰۰±۱/۳۶^{c}	۳۸/۴۲±۰/۸۱^{c}	۸۷/۹۶±۱/۷۶^{c}
۵	۴۴/۶۰±۰/۸۲^{e}	۵۴/۵۷±۱/۰۵^{d}	۱۲۶/۲۸±۲/۰۵^{d}
۶	۴/۷۳±۰/۲۱^{a}	۱/۶۳±۰/۵۴^{a}	۷/۱۹±۰/۷۶^{a}
۷	۶/۶۶±۰/۴۷^{a}	۲/۶۴±۰/۱۴^{a}	۱۱/۹۶±۰/۶۶^{a}

حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشند.

نهایی ریزجلبک‌ها داشته و باعث شکوفایی جلبکی می‌شوند (Schenk *et al*., 2008). بنابراین تولید ریزجلبک‌ها در مقیاس تجاری نیاز به فراهم نمودن مواد مغذی کافی و لازم در محیط‌های کشت دارد. از طرفی آب، مواد مغذی و کربن‌دی‌اکسید حدود ۳۰-۱۰ درصد هزینه‌های تولید را در مزارع تجاری پرورش جلبک شامل می‌گردد (Clarens *et al*., 2010). از طرف دیگر به هنگام پرورش جلبک‌ها، پرورش دهندگان سعی دارند که محیط پرورش جلبک‌ها بازیافت کنند و تا حدودی از چرخه عناصر استفاده کنند ولی این عمل بازدهی جلبک‌ها را کاهش داده که این می‌تواند به‌سبب آلودگی‌های افزایش یافته توسط پاتوژن‌های جلبک‌ها و یا تجمع مواد متابولیسمی ثانویه باشد (Castellanos, 2013).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کودهای شیمیایی، می‌توانند رشد جلبک *هماتوکوکوس* تحت تأثیر قرار دهد به طوریکه در زمان استفاده از اروه + سوپر فسفات (تیمار ۵)، فاکتورهای رشدی جلبک *هماتوکوکوس* تفاوت معناداری را با محیط کشت BG11 نشان نداد که این موضوع می‌تواند نشان دهنده جایگزینی کامل محیط کشت استاندارد با کودهای شیمیایی صنعتی در کشت‌های انبوه باشد.

تحت شرایط نوردهی مستمر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بعداز ۱۴ روز، بیشترین مقدار کلروفیل *a*، بتا-کاروتن و تعداد سلول به ترتیب برابر با ۷/۵ میلی-گرم بر لیتر، ۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر و ۶/۵×۱۰^{۶} سلول در هر میلی لیتر برای جلبک *Dunaliella* به دست آمد (Abu sara *et al*., 2011). نرخ تقسیم *D. salina* در محیط کشت اصلاح شده Dewalne's در حدود ۰/۴۳ بود درحالی که در محیط کشت Walnen's برابر با ۰/۴۰ مشاهده شد (Raja *et al*., 2004). تعداد سلول‌های جلبک *هماتوکوکوس* زمانی که از کود شیمیایی اوره + سوپر فسفات استفاده شد در انتهای روز یازدهم، بالاترین تعداد سلول جلبکی را نشان داد که به‌صورت افزایشی این رشد ادامه داشت و به تعداد ۱/۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر رسید که بالاترین مقدار را در بین سایر تیمارها داشت و از طرف دیگر این تعداد سلول نشان داد که با افزایش تعداد سلول در هر میلی‌لیتر و در شرایطی که افزایش رشد در طول مدت پرورش دیده می‌شود، زیست توده تولیدی نسبت به تیمار BG11 در آب شور کاهش پیدا کرده است که این می‌تواند احتمالاً به دلیل کوچک شدن اندازه سلول‌های جلبک *هماتوکوکوس* در زمان استفاده کامل از کودهای شیمیایی اوره + سوپر فسفات باشد. در دوره نوری ۲۴ ساعته پرورش جلبک *نانوکلروپسیس گادیتانا* (*Nannochloropsis gaditana*) تراکم سلولی، نرخ رشد ویژه، غلظت زیست توده و بازدهی زیست توده به ترتیب برابر با ۴ میلیون سلول در میلی لیتر، ۰/۵۰ (بر روز)، ۰/۳۰ گرم بر لیتر و ۲۸ میلی‌گرم بر لیتر در روز بود (Matos *et al*., 2016). رشد سلول‌های جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* زمانی که از غلظت‌های مختلف شیرابه خوکی استفاده شد و تا زمان خالی شدن محیط از نیتروژن، به صورت ثابت

www.SID.ir

Archive of SID

گزارش شد (Ledda *et al*., 2016). داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که تحت شرایط نوردهی مستمر و دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، بیشترین مقدار نرخ رشد ویژه، نرخ تقسیم شدن در روز، بازدهی مقدار تثبیت کربن دی اکسید، بازدهی زیست توده و زیست توده کل برای جلبک هماتوکوکوس در زمان پرورش در آب لب شور به ترتیب برابر با ۰/۲۹ در روز، ۰/۴۱ در روز، ۳۴ میلی‌گرم بر لیتر در روز، ۱۸/۱ میلی‌گرم بر لیتر در روز و ۱۹۹/۱ میلی‌گرم بر لیتر در روز بود.

فاکتورهای رشد و بیوشیمیایی در گونه‌های مختلف جلبکی می‌تواند به شدت تحت تأثیر شرایط مختلف رشد قرار گیرد (Griffiths *et al*., 2012). مقدار کلروفیل *a* در ۱۸ روز از پرورش *D. tertiolecta* و در روز ۱۶ از پرورش *D. salina* به بالاترین مقدار خود رسید درحالی که این مقدار برای کلروفیل *b* در روز ۱۶ برای هر دو گونه اتفاق افتاد و مقدار کاروتن کل نیز در روز ۲۶ برای *D. tertiolecta* و در روز ۲۴ برای *D. salina* در بالاترین مقدار خود بود (Venkatesan *et al*., 2013). کلروفیل در سلول‌های جلبکی محل‌هایی برای بدام انداختن نور و ذخیره انرژی به شکل ATP و NADPH می‌باشد که افزایش زیست توده افزایش می‌یابد (Maity *et al*., 2014). همچنین Maity و همکاران (۲۰۱۴) عنوان کردند که مقدار کلروفیل و زیست توده با افزایش زمان پرورش، افزایش می‌یابد و مقدار آن‌ها با نور و دما تغییر می‌کند. بر اساس نتایج حاصله از آنالیز رنگدانه‌های جلبک *هماتوکوکوس* در این مطالعه، بیشترین مقدار کلروفیل *a* در تیمار ۵ و در روز یازدهم مشاهده شد (۴۴/۶۰ میکروگرم بر گرم وزن تر) درحالی که بالاترین مقدار کلروفیل *b* و کاروتن کل در تیمار ۳ دیده شد. مقدار کلروفیل در جلبک‌ها به عنوان یک شاخص برای زیست توده آن‌ها محسوب می‌شود (Bricaud *et al*., 2002; Millie *et al*., 1993) ولی در مطالعه انجام شده تقریباً عکس این موضوع دیده شد که این احتمال وجود دارد که اولاً به‌دلیل استفاده از کودهای شیمیایی صنعتی و اثرات سلولی که بر جلبک‌ها داشته است باشد و ثانیاً احتمالاً می‌تواند به دلیل افزایش رنگدانه-های غیرفتوسنتزی سبز رنگ در جلبک‌ها باشد که این رنگدانه‌های غیرفتوسنتزی رابطه مستقیمی با مقدار کلروفیل *a* و *b* در سلول‌های جلبکی دارند (Arar, 1997). از طرف دیگر زمانی که جلبک در معرض کاهش منابع اصلی نیتروژنی قرار می‌گیرد، ترکیبات نیتروژن‌دار مانند نیترات، آمونیوم، آمینواسیدها، پروتئین و رنگدانه ها به مقدار زیاد و یا به‌طور کامل مصرف می‌شوند (Conover, 1975; Dortch, 1982) که این موضوع هم می‌تواند به‌دلیل استفاده سریع جلبک‌ها از مواد نیتروژن‌دار محیط‌های کشت استاندارد بوده باشد چراکه جلبک‌ها نیترات را جذب کرده و نیتروژن موجود در محیط‌های کشت استاندارد به‌صورت ترکیبات نیتراتدار می‌باشد مانند $NaNO_3$ موجود در محیط کشت BG11 که با مصرف سریع این ماده و استفاده از ذخایر داخلی جلبک مانند کلروفیل‌ها (که دارای حلقه پوریفرینی حاوی نیتروژن می‌باشند)، باعث کم شدن مقدار کلروفیل و ثابت ماندن مقدار زیست توده در یک دوره زمانی خاص می‌باشد.

با افزایش مدت زمان پرورش جلبک میزان چربی افزایش می‌یابد ولی مقدار بالاترین مقدار پروتئین و کربوهیدرات در اواسط دوره پرورش برای جلبک‌های *D. salina* و *D. tertiolecta* مشاهده شد (Venkatesan *et al*., 2013). حضور جلبک در معرض شدت نوری بالا و دوره نوری بالاتر باعث افزایش نرخ رشد و مقدار پروتئین می‌شود (George *et al*., 2014). Seyfabadi و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که به هنگام قرارگیری جلبک *Chlorella volgaris* در معرض شدت نوری بالا و دوره نوری بلند مدت، مقدار پروتئین جلبک افزایش یافت. مقدار پروتئین ساخته شده در گروه جلبکی حاوی محیط کشت BG11 که در آب شیرین قرار داشت، مقدار بالاتری را نشان داد که احتمالاً می‌تواند

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دلیل عدم صرف انرژی بیشتری برای تعادل اسمزی جلبک آب شیرین در آب لب‌شور باشد. همچنین مقدار چربی کل در جلبک‌های کشت شده با محیط کشت GB11 در آب لب‌شور در بالاترین مقدار خود بود که این احتمال وجود دارد که تنش شوری باعث القاء تولید چربی در جلبک *هماتوکوکوس* شده است. از طرف دیگر بالاترین مقدار کربوهیدرات کل در تیمارهای ۳ و ۴ و خاکستر در تیمار ۲ نشان داد که تفاوت در مقدار ترکیبات بیوشیمیایی جلبک‌ها به هنگام استفاده از کودهای شیمیایی مختلف (به عنوان منابع نیتروژنی و فسفری) وجود دارد.

تحقیقات قبلی نشان داده است که ریزجلبک-های *Otryococcus braunii*, *D. tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp., *N. oleoabundans* و *Porphyridiumcruentum* به‌عنوان گونه‌های مناسب برای تولید زیست توده (۷۷٪ وزن خشک سلولی) و تولید چربی توسط فرآیند فتوسنتز می‌باشند (Maity *et al*., 2014; Najafi *et al*., 2011; Guan *et al*., 2011; Singh and Gu, 2010) به‌طوری‌که به هنگام پرورش جلبک *هماتوکوکوس* در آب لب‌شور مقدار چربی تولیدی از ۳۶ درصد تجاوز نکرد و این شرایط پرورشی نمی‌تواند گزینه مناسبی برای تولید چربی باشد ولی به جهت تولید زیست توده تا ۰/۲ گرم بر لیتر وزن خشک می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب پرورشی در آب‌های لب‌شور در نظر گرفته شود. تفاوت در مقدار چربی جلبک‌ها عمدتاً به دلیل تفاوت در گونه جلبکی، نوع و مقدار مواد مغذی و شرایط محیطی (آب، نور، دما، کربن دی اکسید) باشد (Maity *et al*., 2014). Rodolfi و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که رابطه معکوسی بین زیست توده و تولید چربی تحت شرایط نامساعد در زمان رشد ریزجلبک ها وجود دارد.

تحقیقات نشان داده که در جلبک‌های *Microcystis* sp. – *Chlorococcum* sp. و *Phormidium* sp. مقدار کل چربی به ترتیب برابر با ۳۰/۵۵، ۸/۸۸ و ۱۸/۶۶ درصد (درصد چربی در رابطه با زیست توده) بوده است (Mahapatra and Ramachandra, 2013). تاکنون گزارشی مبنی بر پرورش جلبک آب شیرین *هماتوکوکوس پلوویالیس* در آب لب‌شور (۷/۵ گرم بر لیتر) وجود نداشته است و تنها از آب شور برای ایجاد تنش به جهت القاء تولید آستاگزانتین و چربی استفاده شده است، بنابراین در این مطالعه نیز رابطه معکوس بین مقدار چربی و مقدار زیست توده تولیدی (در آب لب شور) به هنگام استفاده از کودهای شیمیایی مشاهده شد که با مطالعات انجام شده در این زمینه مطابقت دارد، اما در زمان استفاده از محیط کشت استاندارد BG11 در آب لب‌شور، علاوه بر میزان چربی، میزان زیست توده جلبکی نیز تولیدی افزایش یافت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل اجرای طرح پژوهشی اثر ترکیبی کودهای شیمیایی و محیط کشت استانداردBG11 بر سرعت رشد، ترکیبات بیوشیمیایی، کلروفیل و مقدار کارتنوئید کل جلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* (*Haematococcus pluvialis*) با کد طرح ۹۵۲۶۰ است و هزینه‌های اجرای آن توسط باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد ارومیه تأمین و تخصیص یافته است.

منابع

Abu-Sara N.F., Emeish S., Sallal A.K.J., 2011. The Effect of certain environmental factors on growth and β- Carotene production by *Dunaliella* sp. isolated from the Dead Sea. *Jordan Journal of Biological Sciences* 4, 29-36.

AOAC. 2005. AOAC official method 963.15, 991.20. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. AOAC International, Gaithersburg.

Boussiba S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiology Plant* 108, 111-117.

Boussiba S., Bing W., Yuan J.P., Zarka A. and Chen F. 1999. Changes in pigments profile

www.SID.ir

Archive of SID

species grown under nitrogen replete and limited conditions. Journal of Applied Phycology. 24:989–1001.

Grünewald, K., Hirschberg, J. and Hagen, C., 2001. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. Journal of Biological Chemistry. 276:6023–6029.

Guan, W., Zhao, H., Lu, X., Wang, C., Yang, M. and Bai, F., 2011. Quantitative analysis of fattyacid-based biofuels produced by wild-type and genetically engineered cyanobacteria by gas chromatographyemass spectrometry. Journal of Chromatogr. 1218:8289-8293.

Guillard, R. R. L., 1973. Division rates. In: Stein, J. R., ed. Handbook of Physiological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 289-312.

Hedge, J.E. and Hofreiter, B.T., 1962. In: *Carbohydrate Chemistry,* 17 (*Eds.* Whistler R.L. and Be Miller, J.N.), Academic Press, New York.

Ho, S., Wen-Ming, C. and Jo-Shu, C., 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO_2 mitigation and biodiesel production. Bioresource Technology. 101:8725–8730.

Illman, A.M., Scragg, A.H. and Shales, S.W., 2000. Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme Microbiological Technology. 27:631– 635.

Kumar, K., Mishra, S.K., Shrivastav, A., Park, M.S. and Yang, J.W., 2015. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. Renewable Sustainable Energy Review. 51:875–885.

Ledda, C., Tamiazzo, J., Borin, M. and Adani, F., 2016. A simplified process of swine slurry treatment by primary filtration and *Haematococcus pluvialis* culture to produce low cost astaxanthin. Ecological Engineering. 90:244–250.

Mahapatra, D.M. and Ramachandra, T.V., 2013. Algal biofuel: bountiful lipid from *Chlorococcum* sp proliferating in municipal wastewater. Current Science. 105:47-55.

Maity, J.P., Bundschuh, J., Chen, C.Y. and Bhattacharya, P., 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: present and future perspectives. Review Energy (in press).

in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stress. *Biotechnology Letters* 21, 601-604.

Castellanos C.S. 2012. Batch and continuous studies of *Chlorella vulgaris* in photobioreactors, The University of Western.

Cerón M.C., García-Malea M.C., Rivas J., Acien F.G., Fernández J.M., Del Río E., Guerrero M.G., Molina E. 2007. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Applied Microbiology Cell Physiology* 74, 1112-1119.

Clarens A.F., Resurreccion E.P., White M.A., Colosi L.M. 2010. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental Science Technology* 44, 121-132.

Damiani M.C., Leonardi P.I., Pieroni O., Cáceres E.J. 2006. Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behaviour during cyst germination. *Phycologia* 45, 616-623.

Dere S., Gunes T., Sivaci R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany* 22, 13-17.

Fidalgo J.P., Cid A., Torres E., Sukenik A., Herrero C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166, 105-116.

George B., Pancha I., Desai C., Chokshi K., Paliwal C., Ghosh T., Mishra S. 2014. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology* 171,367-374.

Gordillo F.J., Goutx M., Figueroa F.L., Niell F.X. 1998. Effects of light intensity, CO2 and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *Journal of Applied Phycology* 10, 135-144.

Griffiths M.J., van Hille R.P., Harrison S.T.L. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal

www.SID.ir

Archive of SID

Mandalam R.K., Palsson B. 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in highdensity *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology Bioenergy* 59, 605-611.

Matos A.P., Cavanholi M.G., Moecke E.H.S., Anna E.S.S. 2016. Effects of different photoperiod and trophic conditions on biomass, protein and lipid production by the marine alga *Nannochloropsis gaditana* at optimal concentration of desalination concentrate. *Bioresource Technology* (In Press).

Najafi G., Ghobadian B., Yusafi T.F. 2011. Algae as a sustainable energy source forbiofuel production in Iran: a case study. *Renew Sustain Energy Review* 15, 3870e6.

Raja R., Anbazhagan C., Senthilswamy M., Lakshmi D., Rengasamy R. 2004. Nutritional studies on *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) under laboratory condition. *Seaweed Research Utilization* 26, 127-146.

Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology Bioenergy* 102, 100-112.

Schenk P.M., Thomas-Hall S.R., Stephens E., Marx U.C., Mussgnug J.H., Posten C., Kruse O., Hankamer F.B. 2008. Second generation biofuels: high efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Resource* 1, 20–43.

Seyfabadi J., Raamezanpour Z., Khoeyi Z.A. 2011. Protein, fatty acid and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology* 23, 721-726.

Singh J., Gu S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew Sustain Energy Review* 14, 2596-2610.

Slocombe S.P., Ross M., Thomas N., McNeill S., Stanley M.S. 2013. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology* 129, 51-57.

Takagi M., Karseno Y.T. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunalliela* cells. *Journal of Bioscience Bioenergy* 101, 223-226.

Tang D., Han W., Li P., Miao X., Zhong J. 2011. CO2 biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and Chlorella pyrenoidosa in response to different CO2 levels. *Bioresource Technology* 102, 3071-3076.

Venkatesan S., Swamy M.S., Senthil C., Bhaskar S., Rengasamy R. 2013. Culturing marine green microalgae *Dunaliella salina* Teod. and *Dunaliella tertiolecta* Masjuk in Dewalne's medium for valuable feeds stock. *Journal of Modern Biotechnology* 2, 40-45.

Wang X.W., Liang J.R., Luo C.S., Chen C.P., Gao Y.H. 2014. Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO_2 levels. *Bioresource Technology* 161, 124-130.

Yu S., Hubbard J.S., Holzer G., Tornabene T.G. 1987. Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. QII under different nitrogen regimes. *Journal of Phycology* 23, 289-296.

Zhekisheva M., Zarka A., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S. 2005. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 41, 819-826.

www.SID.ir

Archive of SID

The combination effect of chemical fertilizers and standard BG11 medium on growth rate, biochemical composition, fatty acid profile, chlorophyll and total carotenoid content of *Haematococcus pluvialis* in brackish water

Saeid Vahdat[*1], Behrooz Atashbar[2], Manizheh Biabani[3], Farzaneh Noori[2]

[1]Young Researchers and Elite Club, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
[2]Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
[3]Fishery Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding author: saeidvahdat1989@gmail.com
Received: 2017/7/5 Accepted: 2017/9/6

Abstract

Using of the standard methods for the production of unicellular algae have high harvesting costs and in many cases is not affordable. Therefore chemical fertilizers could be considered as an appropriate alternative for the production of unicellular algae. In this regards, *Haematococcus pluvialis*, were transferred to each of the 3-liters container. The results showed that the specific growth rate, the cell division per day, carbon dioxide fixation efficiency, biomass and total biomass efficiency was significantly higher and lower in treatment 7 and 1 respectively (P<0.05). The highest protein (17.35%), fat (15.46%) and carbohydrate (6.42 and 8.01) content was observed in treatments 6, 7, 2 and 3, respectively (P<0.05). the highest chlorophyll *a* (44.60 mg/g FW) in treatment 5 and chlorophyll *b* (62.19 mg/g FW) carotenoid (152.73 mg/g FW) in treatment 3 (P<0.05).

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, Biochemical composition, Chlorophyll, Total Carotenoids.

www.SID.ir